

氏 名	近 江 理 恵
学 位 の 種 類	博 士 (理 学)
学 位 番 号	第 4433 号
学位授与年月日	平成 16 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当者
学 位 論 文 名	トレオニン合成酵素の構造と機能 (Structure and Function of Threonine Synthase)
論文審査委員	主 査 教 授 広 津 建 副主査 教 授 工 位 武 治 副主査 教 授 中 島 信 昭

論 文 内 容 の 要 旨

トレオニン生合成の最終ステップを触媒するトレオニン合成酵素 (ThrS) は、ピリドキサル5'-リン酸 (PLP) を補酵素として持つPLP酵素である。ThrSはPLP酵素の分類上、Fold Type に属し、さらにアミノ酸配列の相同性から2つのサブファミリー (,) に分けられる。ThrSは 脱離、 置換反応を触媒する唯一のPLP酵素であり、 α -ホスホ-L-ホモセリン (OPHS) を基質とし、L-トレオニンを生成する。これまでの分光学的研究などから、ThrSの反応はPLP酵素に可能なすべての中間体を經由して進行すると予測されている。

本研究ではThrSの誘導適合、基質認識および反応機構をより詳細に理解するため、サブファミリー に属する高度好熱菌由来ThrS (tThrS)、ならびに、サブファミリー に属する大腸菌由来のトレオニン合成酵素 (eThrS) を用いて、X線結晶構造解析を行った。tThrSについては、ネイティブ型酵素と基質アナログである L 2 amino 5 phosphonopentanoic acid (AP5) との複合体の結晶構造を、2.15 及び2.0 分解能で決定することに成功した。また、eThrSについてはAP5との複合体の結晶構造を2.2 分解能で決定した。

tThrSおよびeThrSのAP5との複合体では、AP5の結合により、小ドメインが活性部位を覆うように約25° 移動しており、ThrSにopen型からclosed型への立体構造変化があることを見いだした。このopen closedコンホメーション変化は、小ドメインが基質のカルボキシル基とリン酸基の認識部位を形成するとともに、活性部位を溶媒から遮蔽するという役割を果たしており、ThrSの触媒活性の発現に重要であるということが明らかになった。

また、tThrSとAP5との複合体の立体構造は、ThrSの初めての酵素 基質複合体モデルであり、反応機構を考察する上で新たな知見がいくつか得られた。吸収スペクトルと電子密度の解析から、AP5と補酵素が結合した中間体は、その多くがエナミン中間体で存在していることが示された。このエナミン中間体と活性部位の相互作用からThrSの反応機構を考察し、立体構造に基づいてThrSの立体選択的反応を合理的に説明することができた。しかし一方で、触媒残基であるLys61のアミノ基が、基質のC へのプロトン供与体として働くには遠いという事実がある。このことから、基質から遊離したリン酸がプロトン授受に関与する“ Product assisted catalysis ” を提案した。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

活性中心に補酵素ピリドキサル5'リン酸 (PLP) を結合するトレオニン合成酵素 (ThrS) は、トレオニン合成経路の最終ステップの反応を触媒し、L-ホモセリン5'リン酸からトレオニンとリン酸を生成する。この触媒反応はPLP酵素が触媒する反応の中で最も複雑であり、PLP酵素に可能なすべての中間体を通して進行すると推定されている。ThrSはアミノ酸の一次配列に基づいて、サブグループ と に分類される。申請者はサブ

グループ から高度好熱菌由来のThrS (tThrS) を、サブグループ から大腸菌由来のThrS (eThrS) を選び、X線結晶解析法を用いて、これらの酵素の立体構造を決定した。立体構造に基づいてThrSの誘導適合と基質認識をはじめて明らかにし、触媒反応機構についても新たな知見を得た。

tThrSおよびeThrSの大量発現系を構築し、得られた試料の結晶化を試みた。tThrSについてはネイティブ型とAP5 (基質のエステル酸素をメチレン基で置換した基質アナログ) との複合体の結晶化に成功した。またeThrSについてもAP5との複合体を結晶化した。重原子同型置換法を用いて位相を決め、分解能2.0 2.2 の構造を得た。tThrSはホモダイマーであり、そのサブユニットは大ドメイン、小ドメインとスワップドメインからなる。PLPは大小ドメイン間のインターフェースに結合し、触媒基リシンとシッフ塩基を形成している。ネイティブ型tThrSとtThrS・AP5の立体構造を比較することによって、基質結合時にtThrSの小ドメインが剛体として約25°回転し、基質を活性部位に閉じ込めることを見出した。このopen型からclosed型への構造変化により、基質認識サイトが活性部位に形成される。したがって、誘導適合が基質認識と触媒反応に深くかかわっていることが示された。eThrS・AP5の立体構造もtThrSと同様の誘導適合を示した。

ネイティブ型tThrSとtThrS・AP5の活性部位の構造に基づいて、TThrSの触媒反応の立体化学について検討した。closed型構造において、溶媒側から水分子がPLP AP5結合体へ接近できないこと、触媒基リシンはPLPの真下にあって基質のC とC および補酵素のC4 'へのプロトンシャトルとして機能するのに好都合な幾何学的位置にあることなどから、反応の立体化学の制御の詳細を明らかにした。また、基質より脱離したリン酸が生成物触媒としてC4 ' からC へのプロトン移動にかかわる可能性を提案した。

以上のように、本論文は、tThrSのネイティブ型と基質アナログAP5との複合体およびeThrSとAP5との複合体の高次構造に基づいて、誘導適合、基質認識、反応の立体化学を明らかにし、ThrSの構造と機能の解明に貢献したものであり、構造化学の発展に寄与する多くの成果を得ており、博士 (理学) の学位を授与するに値するものと審査した。